



CTeSP, ANÁLISES LABORATORIAIS

Técnicas de Bioquímica



Componente Prática



CTeSP, ANÁLISES LABORATORIAIS

Técnicas de Bioquímica

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA HIDROLÍTICA NUMA AMOSTRA AMBIENTAL

INTRODUÇÃO

As Enzimas são proteínas especializadas que:

- São catalisadores biológicos extremamente eficientes e aceleram a velocidade da reação, transformando de 100 a 1000 moléculas de substrato em produto por minuto de reação.
- Atuam em concentrações muito baixas
- Atuam em condições específicas de temperatura e pH
- Estão quase sempre dentro da célula, e compartimentalizadas.

Estas apresentam um alto grau de especificidade: cada enzima possui uma organização estrutural específica, permitindo a ligação apenas do(s) seu(s) substrato(s). As enzimas são fundamentais para processos bioquímicos celulares tais como: - degradação das moléculas nutrientes; - transformação e conservação da energia química; - síntese de macromoléculas biológicas a partir de moléculas precursoras simples; reconhecem a glicose.

Para dosar a atividade de uma enzima E que catalisa a conversão $A \Rightarrow B$ é necessário dispor de um meio de ensaio onde essa enzima seja capaz de catalisar a reação. Assim, se sabemos que a enzima E atua numa determinada faixa de valores de pHs será adequado escolher um pH de ensaio dentro dessa faixa e um tampão de pH que seja eficaz nesse pH. Algo semelhante pode ser dito relativamente à temperatura de ensaio: se sabemos que a enzima E não se desnatura entre determinados limites de

temperatura será sensato escolher uma temperatura de ensaio que se situe dentro desses limites.

Este protocolo está dividido em várias etapas: preparação dos extractos enzimáticos, determinação da atividade enzimática hidrolítica e da recta de calibração.

PROCEDIMENTO

1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

As amostras para a atividade enzimática são secas a 30°C durante pelo menos 1 dia. Posteriormente, as amostras são trituradas e crivadas através dum crivo de 1 mm.

2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA HIDROLITICA - GLICOSIDASE E FOSFATASE (adaptado de Shu-Guang et al., 2007)

2.1 HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA DE GLUCOSIDASE NUMA AMOSTRA SÓLIDA

Princípio

O estudo da actividade é baseada na libertação do p-nitrofenol após a hidrólise do p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo

MATERIAIS/REAGENTES/EQUIPAMENTOS

p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo ($C_{12}H_{15}NO_8$) (PNG) - 0,05 M

Tampão MUB - Modified Universal Buffer

Preparar NaOH 1M e HCl 0.1M

Pesar 0,605g de tris (hydroxymethyl)aminomethane, 0,58 g ácido maleico, 0,7 g ácido cítrico, 0,314 g ácido bórico, e adicionar 24,4 ml de 1 M NaOH e água destilada até volume final de 50 ml.

A solução tampão é preparada com os 50 ml da solução anterior; é titulada com HCl 0,1 M até pH de 6,0. Por fim adicionar água destilada até perfazer 250 mL

Tris(hidroximetil)aminometano, $C_4H_{11}NO_3$ 0,1 M (pH 12)

$CaCl_2$ 0,5 M

p-nitrofenol ($C_6H_5NO_3$) – ver recta padrão (ponto 3.)

Incubadora

Espectrofotómetro ultravioleta

PROCEDIMENTO

- Preparar a solução de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido ($C_{12}H_{15}NO_8$) 0,05 M; - substrato
- Num tubo de centrifuga adicionar 2 mL da solução tampão MUB (pH 6,0);
- Juntar 0,5 mL de substrato e
- Adicionar a 0,5 g de amostra
- Incubar durante 1 hora a 37°C;
- A reação é parada pelo arrefecimento rápido a 2°C durante 15 min
- Adicionar 0,5 mL de $CaCl_2$ 0,5M;
- Adicionar 2 mL de Tris 0,1 M a pH 12;
- Centrifugar a 4000 g for 10 min
- Determinar o p-nitrofenol (PNP) a 420 nm num espectrofotómetro
- Analisar um branco (a adição do tampão de reação contendo o substrato só foi feita após a adição do sistema $CaCl_2$ +Tris 12 imediatamente antes da centrifugação); => fazer o procedimento igual mas sem a amostra
- Obter a curva de calibração com soluções padrão de p-nitrofenol ($C_6H_5NO_3$, *Sigma* 104-8) em condições idênticas às da mistura reacional, no que respeita a volume, tampão sem substrato, tratamento com o

sistema $\text{CaCl}_2 + \text{Tris}$. A gama de concentrações de *p*-nitrofenol em solução poderá ser entre $0-80 \mu\text{g mL}^{-1} \Rightarrow$ fazer o procedimento igual mas sem a amostra e sem substrato

2.2 FOSFATASES ALCALINAS

Princípio

O estudo da atividade é baseada na libertação do *p*-nitrofenol após a hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato disódico

MATERIAIS/REAGENTES/EQUIPAMENTOS

- *p*-nitrofenilfosfato disódico ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_6\text{PNa}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, *Sigma 104*[®]) (*p*-NPP) - 0,115 M
- Tampão MUB
- CaCl_2 0,5 M;
- NaOH 0,5 M;
- *p*-nitrofenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$) - ver recta padrão (ponto 3.)
- Espectrofotómetro ultravioleta.
- Incubadora;

PROCEDIMENTO

- Preparar a solução de *p*-nitrofenilfosfato disódico ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_6\text{PNa}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, *Sigma 104*[®]) *p*-NPP 0,115 M; - Substrato
- Num tubo de centrifuga adicionar 2 mL da solução tampão MUB (pH 6,0);
- Juntar 0,5 mL de substrato e
- Adicionar a 0,5 g de amostra
- Incubar durante 1 hora a 37°C;
- A reacção é parada pelo arrefecimento rápido a 2°C durante 15 min

- Adicionar 0,5 mL de CaCl_2 0,5M;
- Adicionar 2 mL NaOH 0,5M
- Centrifugar a 4000 g for 10 min
- O produto da reação (*p*-nitrofenol) é determinado por absorvância a 420 nm
- Analisar um branco (adição do tampão de reação contendo o substrato só foi feita após a adição do sistema $\text{CaCl}_2+\text{NaOH}$ imediatamente antes da centrifugação); => fazer o procedimento igual mas sem a amostra
- Obter a curva de calibração com soluções padrão de *p*-nitrofenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$, *Sigma* 104-8) em condições idênticas às da mistura reacional, no que respeita a volume, tampão sem substrato, tratamento com o sistema $\text{CaCl}_2+\text{NaOH}$ e filtração. A gama de concentrações de *p*-nitrofenol em solução poderá se entre $0-80 \mu\text{g mL}^{-1}$ => fazer o procedimento igual mas sem a amostra e sem substrato

Nota: A curva vai estabelecer uma reacção linear entre os valores de absorvância a 420 nm e as diferentes concentrações de *p*-nitrofenol. Assim sendo sempre que os valores de absorvância registados para a solução centrifugada excederam o limite máximo da curva de calibração, procedeu-se à sua diluição com água destilada.

3. RECTA PADRÃO P-NITROFENOL

- Solução standard de p-nitrofenol

Num balão volumétrico de 1000 ml dissolver 1g de p-nitrofenol com água destilada, completar o volume a 1000 ml com água destilada.

- Solução diluída de p-nitrofenol

Num balão volumétrico de 100 ml diluir 2 ml da solução standard de p-nitrofenol, completar o volume a 100 ml com água destilada.

- Modo operatório:

Seguir a tabela

concentração de p-nitrofenol µg/ml	0	10	20	30	40	50	60	70	80
volume solução diluída de p-nitrofenol (ml)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
volume de tampão (ml)	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0

Agitar no Vortex

Adicionar 0,5 ml de CaCl₂ 0,5 M

Agitar no Vortex

Adicionar 2 ml da base:

NaOH 0,5M para as fosfatases ou

THAM (Tris) pH 12 para glucosidases

Agitar no Vortex

Filtrar e centrifugar

Ler a absorvância a 420 nm

BIBLIOGRAFIA

Qualquer livro de Bioquímica, por ex. H.R. Horton, L.A. Moram, R.S. Ochs, J.D. Rawn, K.G. Scrimgeour, *Principles of Biochemistry*, 3ª ed., Prentice Hall, 2002.

Shu-guang, L., Tsuyoshi, I., Masao, U. Masahiko, S. (2007). Start-up performances of dry anaerobic mesophilic and thermophilic digestions of organic solid wastes. *Journal of Environmental Sciences* 19, 416–420